



(51) 国際特許分類6 C12Q 1/68, C12N 15/11, C07K 1/00, 7/00, 14/00, G06F 15/42, C07H 21/00	A1	(11) 国際公開番号 WO99/11818 (43) 国際公開日 1999年3月11日(11.03.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03854 (22) 国際出願日 1998年8月28日(28.08.98) (30) 優先権データ 特願平9/249679 1997年8月28日(28.08.97) JP (71) 出願人 ; および (72) 発明者 輕部征夫(KARUBE, Isao)[JP/JP] 〒216-0002 神奈川県川崎市宮前区東有馬一丁目3番16号 Kanagawa, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 岡部洋一(OKABE, Yoichi)[JP/JP] 〒169-0051 東京都新宿区西早稲田一丁目22-3-2702 Tokyo, (JP) 隅藏康一(SUMIKURA, Koichi)[JP/JP] 〒153-0041 東京都目黒区駒場四丁目6-20-102 Tokyo, (JP)	(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP) (81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシ ア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類 国際調査報告書	
(54)Title: METHOD FOR DETECTING HIGHLY FUNCTIONAL POLYPEPTIDES OR NUCLEIC ACIDS (54)発明の名称 機能性の高いポリペプチド又は核酸を探索する方法 (57) Abstract A molecular design method which fundamentally comprises artificially reconstructing genes by means of exon shuffle among a number of individuals. More particularly, this method comprises the steps of (a) synthesizing a number of polypeptides or nucleic acids differing in sequence from each other; (b) measuring the fitness of the synthesized polypeptides or nucleic acids on the laboratory level, (c) ranking the polypeptides or nucleic acids synthesized in step (a) depending on the fitness; (d) preparing a "shuffling library" of the sequences obtained by shuffling the partial structures among individuals selected depending on the rank; (e) synthesizing polypeptides or nucleic acids belonging to the above library; and (f) repeating the procedures of steps (b) to (e) arbitrary times with the use of the polypeptides or nucleic acids obtained in step (e). By using this method, molecules can be evolved drastically and quickly as compared with the conventional genetic algorithm, which makes it possible to efficiently detect functional polymers, in particular, polypeptides or nucleic acids having specific functions and having novel structures which never occur in nature.		

(57)要約

この発明は、複数の個体間でのエキソン・シャフリング様の遺伝子の再編成を人工的に行うことを基本とする分子設計法に関する。

具体的には、(a)互いに異なる配列を有する複数のポリペプチド又は核酸を合成し、(b)合成されたポリペプチド又は核酸の適応度を実験室レベルで測定し、(c)(a)で合成されたポリペプチド又は核酸を適応度に応じて順位付けし、(d)順位に応じて選択した個体間で部分構造のシャフリングを行って得られる配列の「シャフリング・ライブラリー」を作成し、(e)該ライブラリーに属するポリペプチド又は核酸を合成し、(f)(e)で得られたポリペプチド又は核酸について、さらに(b)～(e)を任意の回数繰り返す、工程を含む。

この方法により、従来の遺伝的アルゴリズムよりも劇的で迅速な分子の進化を行わせることができ、機能性高分子の、特に特定の機能を有し天然には存在しない新規な構造を有するポリペプチド又は核酸の効率的な検索が可能となった。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		

明細書

機能性の高いポリペプチド又は核酸を探索する方法

技術分野

本発明は生物学の分野、詳しくは、ポリペプチド又は核酸の設計に関する。

背景技術

蛋白質、DNA、RNAなどの生体高分子は、生理活性、分子認識、触媒活性といった多様な機能を示す。もしこのような高分子の機能を自由にデザインすることが可能になれば、全く新しい機能性高分子を創出することが可能になり、医薬、食品などの広範な分野に大きな影響を与えることが期待される。

ところで、最近、配列空間を探索して新しい機能性生体高分子を設計するという研究が精力的に行われている。N種類の基本となるユニットがL個つながってできた分子に対しては、 N^L 種類の配列が可能であり、L次元の配列空間を設定することができる。任意の配列は、この配列空間上の1点として表される。特定の活性に注目すると、各配列はそれぞれ異なる大きさの活性を示すので、配列空間上の各点の上に、対応する配列が示す当該活性の大きさをプロットすると、L次元の曲面が現れる。これが適応度の地形であり、配列空間の探索は、適応度の地形の歩行と言い換えることもできる。

SELEX法(Ellington, A. D. & Szostak, J. W., 1990, Nature 346, 818-822; Tuerk, C. & Gold, L., 1990, Science 249, 505-510.)は、配列空間を探索する手法の一つである。DNA又はRNAに関して、特定の長さの配列をすべて含むような分子集団を作っておき、特定の活性を指標とした選択と選択された分子の増幅を繰り返すことにより、目的の機能を持つ分子を濃縮するというものである。遺伝情報と表現型を対応づけることによってペプチドに対してこれと同じことを行う

のが、ファージディスプレイ法(Scott, J. K. & Smith, G. P., 1990, Science 249, 386-390.)やポリソームディスプレイ法(Mattheakis, L. C. et. al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 9022-9026.)である。しかし、これらの手法においては、多数の分子の反応が同じ溶液内で起こり、実際には単一分子の反応の時は起こり得ない競争や阻害が生じるため、濃縮された配列が最適化された機能を持っているとは限らない。また、2種類の異なる配列が同程度の活性を持っているとき、長い方の配列はもともと集団内の存在割合が低いために、最終的な塩基配列解読の段階で検出されにくいという欠点もある(Sumikura, K. et. al., Nucleic Acids Symp. Ser., in press.)。

それに対して、配列空間内の一つ一つの配列について別個に活性測定を行うのが、固相合成法(Fodor, S. P. A. et. al., 1991, Science 251, 767-773.)である。これは、基板上のどの位置にどの配列が存在するかが分かるようにしておき、その基板上で反応を行って反応性の大小をモニタリングし、高活性な配列はどれかを知るというものである。この手法は、可能なすべての配列の活性をそれぞれ個別に調べるため、扱える配列の長さに限界がある上、結合能などの固相上で確認できる活性についてしか調べることができない。また、プーリング・ストラテジー(Kauffman, S. A. & Macready, W. G., 1995, J. theor. Biol. 173, 427-440.)は、配列上の個々の残基について順に最適なユニットを決めてゆくことにより、左記の手法の長さや活性に関する制約を克服しようとしたものであるが、この手法は個々の残基が活性に対してそれぞれ独立に寄与している場合のみにしか有効ではない。

以上のように、分子集団をひとまとめに扱って選択と増幅を繰り返す戦略では、多くの配列を検証できるものの得られた配列が最適なものかどうか疑わしく、一方、すべての配列の活性を個別に測定する戦略では、検証可能な条件が限られてしまう。そこで、配列空間の中の一部の個体の活性を個別に調べ、その結果に基づいて次に活性を調べる配列を決める、という操作を何世代かにわたって繰

り返して最適解に近づいてゆくという手法が考案された(Yokobayashi, Y., 1996, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 2435-2437.)。この戦略が適切に働けば、配列空間の中のごくわずかな数の分子を調べるだけで最適な配列を知ることができ、しかも得られた配列の最適解としての信頼性も高いと考えられる。

横林らは、上記の戦略をとる際に、「遺伝的アルゴリズム」を用いて次の世代の個体を決めるという実験を行った(Yokobayashi, Y., 1996, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 2435-2437.)。生命の進化においては、環境に適した遺伝子の選択、遺伝子の組み換え、それに突然変異が重要な役割を果たしていると考えられるが、遺伝的アルゴリズムとは、このような進化のメカニズムを数学的にモデル化したものである(Forrest, S., 1993, Science 261, 872-878.)。遺伝的アルゴリズムにおいては、通常、電算機上で、遺伝子に見立てた一組の文字列の集合に対して、選択、組み換え、突然変異の3つの過程をモデルとした数学的な演算を施すことによって、文字列の集合を目的に叶ったものへと進化させてゆく。

前述の横林らの実験では、6アミノ酸からなるペプチドのトリプシン阻害活性を、1世代あたり24配列、6世代にわたって調べている。阻害活性の平均値は初期世代から最終世代までコンスタントに上昇したが、阻害活性の最大値に関しては、最終世代の値と初期世代の値の比が1.03であり、ほとんど変わらない大きさであった。このことから、従来の遺伝的アルゴリズムは各世代の活性の平均値の上昇にはある程度機能するものの、最適解の探索効率は低いと考えられる。

発明の開示

本発明は、効率的に、機能性の高い生体高分子を設計する手法を提供することを課題とする。

自然界におけるタンパク質の進化は、それをコードする遺伝子の突然変異、2つの親個体の遺伝子の間で生じる組み換え、そして環境に適応した個体の選択という過程を経て進むと考えられており、遺伝的アルゴリズムもこの過程をモデル

化している。

一方、長期的なスパンでの進化の様子を眺めると、タンパク質は、ある程度の長さを持ったポリペプチドをコードする多種多様な遺伝子を基本ユニットとし、それらのユニットをつなぎ合わせることでより高い機能を獲得したと考えられている。真核生物の遺伝子の多くは、アミノ酸に翻訳される領域（エキソン）とエキソン間の非翻訳領域（イントロン）から成り、タンパク質のアミノ酸配列は複数のエキソンに分かれてコードされている。長いスパンで見ると、エキソンがタンパク質の進化の基本ユニットであり、イントロンはエキソンの切り混ぜ（エキソン・シャフリング）を行うための領域であると考えるのが、遺伝子のエキソン説(de Souza, S. J. et. al., 1996, Genes Cells 1, 493-505.)である。実際、上皮増殖因子蛋白質のあるドメインをコードしているエキソンと同じものが、低密度リボ蛋白質受容体、血液凝固因子IX及びXという全く関連のない蛋白質に見出されており(Sudhof, T. C. et. al., 1985, Science 228, 815-828.)、エキソン・シャフリングがタンパク質の進化の駆動力となったことを示唆している。アミノ酸を基本ユニットとして、可能な組み合わせをすべて検証するよりも、エキソン・シャフリングの方がより迅速に高機能のタンパク質を作り上げることができると考えられる。

本発明者らは、このエキソン・シャフリングという進化のメカニズムに注目し、電算機を利用して複数の個体間でのエキソン・シャフリング様の遺伝子の再編成を人工的に行うことを基本とする「シャフリング戦略」という分子設計法を開発した。この方法を用いることにより、従来の遺伝的アルゴリズムよりも劇的で迅速な分子の進化を行わせることができ、従って、より効率的に機能性高分子を検索することが可能となった。

すなわち、本発明は、以下のものを含む。

(1) 以下の工程を含む、機能性の高いポリペプチド又は核酸を探索する方法。

(a) 互いに異なる配列を有する複数のポリペプチド又は核酸を合成し、

- (b) 合成されたポリペプチド又は核酸の適応度を実験室レベルで測定し、
- (c) 工程 (a) で合成されたポリペプチド又は核酸を適応度に応じて順位付けし、
- (d) 順位に応じて選択した個体間で部分構造の切り混ぜ（シャフリング）を行うことにより得られた配列からなる「シャフリング・ライブラリー」を作成し、
- (e) 「シャフリング・ライブラリー」に属するポリペプチド又は核酸を合成し、
- (f) 工程 (e) で得られたポリペプチド又は核酸について、さらに工程 (b) ないし工程 (e) を任意の回数繰り返す。
- (2) 工程 (d) において、シャフリングを行うことにより得られた配列を有するポリペプチド又は核酸とは別個に、特定の配列に対して突然変異を導入した配列を作成し「シャフリング・ライブラリー」に加えることを特徴とする、(1) 記載の方法。
- (3) 特定の配列を、工程 (c) における一定以上の順位を有する配列とする、請求項 2 記載の方法。
- (4) 工程 (d) において、シャフリングを行うことにより得られた配列の少なくとも 1 つに対して、更に突然変異を導入した配列を作成し「シャフリング・ライブラリー」に加えることを特徴とする、(1) 記載の方法。
- (5) 工程 (d) において、一定の順位以上の個体間のみでシャフリングを行うことを特徴とする、(1) ～ (4) のいずれかに記載の方法。
- (6) 工程 (d) において、一定の順位以上の個体を更に、上位から下位に複数のグループとし、それぞれのグループの中でシャフリングを行うことを特徴とする、(5) 記載の方法。
- (7) (1) ～ (6) のいずれかに記載の方法により得られ一定以上の適応度を有する、天然には存在しないポリペプチド又は核酸。

なお、本明細書において、「シャフリング」とは、ポリペプチド又は核酸の配列を複数の特定のブロック（これを「仮想エクソン」と名付ける）に分割し、複

数の個体の間で仮想エクソンを入れ替え、新しいポリペプチド又は核酸の配列を作成する操作を指す。また、本明細書において「シャフリング・ライブラリー」とは、特定のポリペプチド又は核酸の配列に対する「シャフリング」の操作を行った結果生じた配列群を指す。

本発明において、ポリペプチド又は核酸を合成するには、当業者に知られた手段、例えばポリペプチドについてはt-Boc法(Merrifield, B., 1986, Science 232, 341-347.)又はFmoc法(Gorka, J. et. al., 1989, Pept. Res. 2, 376-80.)、核酸についてはホスホアミダイト法(Itakura, K. et. al., 1984, Ann. Rev. Biochem. 53, 323-356.)等を用いることができる。

本明細書において「適応度」とは、個々の配列を有するポリペプチド又は核酸が特定の生理活性をどれくらい示すかを表す指標であり、通常、実験室レベルでの測定により決定される。例えば、ポリペプチドの適応度としては、標的分子に対する結合活性又は抗生物質としての活性等があげられ、前者はELISA法(Creighton, T. E. (Ed), 1989, Protein Structure. A Practical Approach, IRL Press.)又はBIAcore(Griffiths, D. G. & Hall, G., 1993, Tibtech 11,122-130.)により、また後者は菌体に対する生育阻害能を調べることにより、測定することができる。また、核酸の適応度としては、タンパク質に対する結合活性又は特定の塩基配列を持つ核酸を切断する触媒活性等があげられ、前者はELISA法、BIAcore、又はゲルシフト法(Latchman, D. S., 1993, Transcription Factors, IRL press.)により、また後者は放射性ラベルを用いた方法(Santoro, S. W. & Joyce, G. F., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4262-4266.)又は電気泳動(Cantor, C. R. & Schimmel, P. R., 1980, Biophysical Chemistry, Chapter 12, Freeman.)により、測定することができる。

本発明において、活性測定とシャフリングのサイクルは通常5回(世代)以上行い、好ましくは8回以上行い、更に好ましくは10回以上行う。また、シャフリングは適応度が上位の配列を対象に行うことが好ましく、通常上位50%以内で行

い、好ましくは上位40%以内で行い、更に好ましくは上位25%以内で行う。ただし、シャフリングを行う配列をあまりに限定しすぎると、最適解でなく局所解に行き着いてしまいやすいので、注意が必要である。

更に、一定の順位以上の個体を、順位に応じて複数のグループに分け、それぞれのグループの中でシャフリングを行うこともできる。これにより、多数の配列の間の大域的なシャフリングと少数の配列の間の局所的シャフリングを並行して行うことができる。この場合、例えば、上位20%以内、及び上位40%以内の2つのグループを設定することが可能であるが、上位個体のグループからはより多数の次世代個体が生じるように設定すると、多くの場合において、より迅速に最適解探索を行うことができると考えられる。

更に、本発明においては、仮想エクソンのシャフリングによる配列の再編成だけでは使用できる材料が限定されてしまうので、仮想エクソンとして存在する配列に対して突然変異を導入することによって、より多くの多様性を配列群に与えることが重要となる。突然変異には、点突然変異、欠失変異、挿入変異、逆位、転座など、通常のあらゆる変異が含まれる。具体的には、シャフリングを行うことにより得られた配列を有するポリペプチド又は核酸とは別個に、特定の個体に対して突然変異を導入した配列を作成し「シャフリング・ライブラリー」に加えることができる。突然変異を導入する個体としては、適応度の高い個体を選択することが好ましい。また、別の方法として、シャフリングを行うことにより得られた配列を有するポリペプチド又は核酸に対して、更に突然変異を導入した配列を作成し「シャフリング・ライブラリー」に加えることができる。

なお、本発明においてシャフリングを行う対象となる配列として、適応度の高さに加えて、配列の「孤立度」の高い配列を優先的に選択することができる。ここで、配列の「孤立度」とは、特定の配列について、同一世代の他の配列との類似性の低さを示す指標であり、特定の配列と同一世代の他のそれぞれの配列との「類似度」の総和に反比例するものとして定義することができる。なお、ここで

いう配列の「類似度」とは、2つの配列の間の類似性を示す指標のことであり、例えば、2つの配列を比較して、同一位置に同一残基又は塩基が存在する時を1ポイントとし、合計のポイント数で定量化することが可能である。具体的には、同一世代の各配列を「適応度」と「孤立度」との積によって順位付けし、一定の順位以上の個体間のみでシャフリングを行うことができる。また、同一世代の各配列を「適応度」と「孤立度」との積によって順位付けし、一定の順位以上の個体を更に、順位に応じて複数のグループとし、それぞれのグループの中でシャフリングを行うこともできる。

なお、本発明において、当初の（第1回目のシャフリングを行うもととなる）配列集団は、天然に存在する配列を含んでいてもよい。この場合は、天然に存在する分子の機能を更に向上させることが可能となる。

また、本発明において、当初の配列として、ランダムな配列を用いることもできる。ランダムな配列を出発配列としても、「シャフリング戦略」によって適応度が顕著に上昇していくので、実用上何ら問題はない。むしろ、ランダムな配列を出発配列とする方が、天然型とは構造が大きく異なる高活性の生体高分子にたどり着く可能性が高くなるともいえる。

従来の生物学においては、まず生体高分子を探索し、その後該分子の機能を解析していくという手法、又は、まず特定の生命現象を解析し、該現象を誘導している生体高分子を探索するという手法がとられていた。いずれの手法にせよ、得られる生体高分子は、生命現象に直接関与しているものに限られていた。本発明においては、生命現象に直接関与していないポリペプチド又は核酸も、探索の対象となる。即ち、本発明においては、生命現象のみならず、あらゆる化学反応、特定の機能を有する構造の形成などに関与するポリペプチド又は核酸を、自由に探索できるところが大きな特徴といえる。

図面の簡単な説明

図1は、ペプチドと抗体の間の結合定数（KA）の比を表す図である。

図2は、シャフリング戦略と遺伝的アルゴリズムを比較した図である。横軸は分子のバリエーション、縦軸は100回の試行における最大値の平均を表す。

図3は、ダブルGカルテットの構造を表す図である。

図4は、トリプルGカルテットの構造を表す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明は下記実施例に制限されるものではない。

〔実施例1〕既知のタンパク質に結合する新規ペプチドの設計のシミュレーション（赤血球凝集素由来のペプチドとモノクローナル抗体との結合データに基づく、適応度の地形の探索）

シャフリング戦略による分子設計の特徴を明らかにするために、実際の測定データに基づいて適応度の地形を設定し、シャフリングを行い、インフルエンザウイルスの赤血球凝集素（HA）と親和性の高いタンパク質の検索を行った。

（1）適応度の地形のもとになった実験データ

インフルエンザウイルスの赤血球凝集素(HA)は、ウイルスの膜面タンパク質であり、これを抗原として宿主の体内でウイルスに対する抗体が産生される。HAは550残基の同一サブユニットからなる三量体で、その単量体は、HA1及びHA2という2つのポリペプチド鎖から構成されている(Wilson, I. A. et. al., 1981, Nature 289, 366-73.)。

HA1の100～108番に相当するペプチドは、Fab 17/9というモノクローナル抗体と結合することが知られている(Rini, J. M. et. al., 1992, Science 255, 959-965.)。Churchillらは、HA1の101～107番に相当するペプチド(101D-102V-103P-104D-105Y-106A-107S)のすべての1アミノ酸置換体（計113個）について、Fab 17/9に対する結合能を競合ELISA法によって調べ、IC₅₀の値をそれぞれについて計算

した(Churchill, M. E. A. et. al., 1994, J. Mol. Biol. 241, 534-556.)。IC 50は、ここでは、野生型の配列を持つコントロール・ペプチドのFab 17/9に対する結合を50%阻害するのに必要なそれぞれのアナログの濃度のことである。

(2) 適応度の計算

IC 50はペプチドと抗体の間の解離定数(KD)に比例すると考えてよいので(Aita, T. & Husimi, Y., 1996, J. theor. Biol. 182, 469-485.)、IC 50の逆数は、ペプチドと抗体の間の結合定数(KA)に比例する。図1 (ChurchillらのFigure 7をもとにして作成)は、各アナログのIC 50の逆数をコントロール・ペプチドのIC 50の逆数で割った値を示す(なお、図1中の英文字は、アミノ酸の1文字コードを表す)。上の理由によりこれらの値はアナログとコントロール・ペプチドのKA値の比であると考えて良い。

タンパク質同士の相互作用やタンパク質とDNAの結合に関しては、統計的に見て、自由エネルギー変化の加算性が成り立つ(Wells, J. A., 1990, Biochem. 29, 8509-8517.)。そこで、7アミノ酸から成るペプチドのFab 17/9に対する結合能についても、すべての部位のアミノ酸置換は、概ね、結合能に対してそれぞれ独立に作用すると考えることができる。つまり、野生型配列に対するある1アミノ酸置換体をX、それとは別の部位に1アミノ酸置換が入った配列をY、それら2つのアミノ酸置換を合わせ持つ配列を(X, Y)で表すと、

$$\Delta\Delta G(X, Y) = \Delta\Delta G(X) + \Delta\Delta G(Y)$$

と考えられる(なお ΔG は結合による自由エネルギー変化を表し、 $\Delta\Delta G$ は野生型に対するアミノ酸置換による ΔG の変化量を表す)。結合定数KAと自由エネルギー ΔG との関係は、

$$KA = \exp(-\Delta G/RT)$$

で表される(Aita, T. & Husimi, Y., 1996, J. theor. Biol. 182, 469-485.)ので、上の仮定のもとでは、

$$KA(\text{置換型})/KA(\text{野生型}) = \exp(-\Delta\Delta G(\text{置換型})/RT)$$

が成り立つ。従って、

$$\begin{aligned} K_A(X,Y)/K_A(\text{野生型}) &= \exp(-\Delta\Delta G(X,Y)/RT) \\ &= \exp(-(\Delta\Delta G(X) + \Delta\Delta G(Y))/RT) \\ &= \exp(-\Delta\Delta G(X)/RT) \cdot \exp(-\Delta\Delta G(Y)/RT) \\ &= (K_A(X)/K_A(\text{野生型})) \cdot (K_A(Y)/K_A(\text{野生型})) \end{aligned}$$

となり、任意のアミノ酸配列について、図1の値を掛け合わせるにより、Fab 17/9に対する平衡結合定数(K_A)の相対値を求めることができる。

(3) コンピューター・シミュレーションの条件

シャフリング戦略及び単純な遺伝的アルゴリズムによる分子設計のシミュレーションを行った。条件の詳細は次の通りである。

[シャフリング戦略]

最初に、ランダムな配列を持つ20個のペプチドを生成させた。それぞれのペプチドの適応度 (Fab 17/9に対する結合能) は、(2)により、図1の値に基づく計算から求められる。この結合能に従って、ペプチドを順位付けした。次に、7つのアミノ酸を2-2-3に分割して3つの仮想エクソンを設定し、上位8個体の間で仮想エクソンのシャフリングを行って次の世代の個体を8個体作製した。シャフリングにあたっては、適応度に比例して仮想エクソンを残しやすくした。上位2個体については、仮想エクソンのすべての組み合わせが生じるようにして6個体を作製した。それに加えて、上位3個体のそれぞれに対して、1個体につき1残基の突然変異が生じるようにして新しい個体を作製した。1個体から2つの突然変異体が生じるものとした。このようにして、ある世代の20個の個体から、次の世代の20個の個体を作られた。

このような、適応度の計算とその結果に基づく次世代個体の作製を40世代にわたって行った。また、この40世代にわたる探索を1回の試行と数え、100回の試行を行って結合能の定向進化の様子を調べた。

[遺伝的アルゴリズム]

最初に、ランダムな配列を持つ60個のペプチドを生成させた。それぞれの配列の適応度の計算に関しては、上に同じである。次世代個体の作製の際には、結合能に比例した確率で2つの親個体を選び、それらの間でランダムな位置での組換えを生じさせることにより新たな2つの個体を作製した。また、0.1の確率で突然変異が入るものとした。このようにして次の世代の60個体が作製された。

このような、適応度の計算とその結果に基づく次世代個体の作製を40世代にわたって行った。また、この40世代にわたる探索を1回の試行と数え、100回の試行を行って結合能の定向進化の様子を調べた。

(4) コンピューター・シミュレーションの結果

各世代における適応度の最大値を100回の試行に関して平均した値、各世代における適応度の平均値を100回の試行に関して平均した値、各世代における適応度の最小値を100回の試行に関して平均した値、その世代にいたるまでに集団中に存在した分子のバリエーション（つまり、実際に合成しなくてはならない分子は何種類か、を示す値）を100回の試行に関して平均した値、をそれぞれ算出した。

図2は、横軸に分子のバリエーション、縦軸に100回の試行における最大値の平均をとり、シャフリング戦略と遺伝的アルゴリズムを比較したものである。これを見ると、シャフリング戦略の方が遺伝的アルゴリズムよりも効率よく最適解を探索していることが分かる。同様に、各世代における適応度の平均値を100回の試行に関して平均した値、各世代における適応度の最小値を100回の試行に関して平均した値についても、シャフリング戦略の方が遺伝的アルゴリズムよりも効率よく最適解を探索していることが判明した。また、適応度が初めて1を超えるまでにいくつの個体を合成しなくてはならないか、について比較してみると、シャフリング戦略の場合は129個体、遺伝的アルゴリズムが155個体となり、ここからも遺伝的アルゴリズムに対するシャフリング戦略の探索効率の高さを見て取ることができる。

(5) 別の条件によるシャフリング

シャフリング戦略の探索効率の再現性を確かめるために、上とは別の条件でシャフリングを行ってみた。上と異なる点は、シャフリングにあたって、適応度に比例して仮想エクソンを残す際に、個体間の適応度の差が激しい初期世代においても配列の多様性が保たれるよう、適応度に関してシグマ・スケーリングを行ったことである。本実施例においては、もとの適応度を f 、変換後の適応度を f' 、その世代の個体の適応度の平均値を f_{avr} 、適応度の標準偏差を σ とすると、

$$f' = f - (f_{avr} - 3 \times \sigma)$$

という式で変換を行った。100回の試行の平均を取ると、適応度が初めて1を超えるまでに合成した分子の数は、119個体となり、シャフリング戦略の探索効率の高さが確かめられた。

〔実施例2〕 トロンピンに結合する一本鎖DNAの配列の最適化

実施例1では、統計的な知見に従って、自由エネルギー変化の加算性が完全に成立するという仮定に基づき、適応度の地形を設定してコンピューター・シミュレーションを行った。一方、実際に実験室レベルで適応度を測定して分子設計を行うにあたっては、複数のアミノ酸置換や塩基置換が相関して適応度に影響している場合もあると考えられる。また、測定機器に検出限界によりすべての配列の適応度を測定できるとは限らないなど、シミュレーションとは異なる状況が生じる。そこで、実際に分子を合成して適応度を測定するという過程を含む、次のような実験を行った。

(1) トロンピンとトロンピン・アプタマー

トロンピンは、セリンプロテアーゼの一種のタンパク質であり、血液凝固をはじめとする様々な機能を担っている。5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3' (配列番号:1) という15残基から成る一本鎖DNAは、トロンピン・アプタマーと呼ばれ、トロンピンに結合しその生理活性を阻害することが知られている(Bock, L. C. et. al., 1992, Nature 355, 564-566.)。またこの分子は、図3のように、2つのG-カルテット構造によって安定化される立体構造をとっている(Wang, K. Y. et. al., 19

93, Biochemistry 32, 1899-1904.)。

今回、トロンビン・アプタマーの2つのG-カルテット構造以外の3つの部分を仮想エクソンとして設定し、これらの部分がどのような配列に最適化されるかを調べた。すなわち、

5'-GGNNGGNNGGNNGG-3' (Nは、A、C、G、又はTを表す)

なる20個のオリゴヌクレオチドを出発点とし、シャフリング戦略による次世代の設計と合成・適応度の測定を繰り返し、生じてくる配列を追跡したのである。

(2) 適応度の測定法

それぞれの配列の適応度（トロンビンに対する親和性）の測定は、表面プラズモン共鳴の原理を利用した実験装置であるBIAcore2000 (BIAcore AB社) を用いて行った。

合成された一本鎖DNAをBIAcore2000用のセンサーチップ上にカルボキシメチルデキストラン及びストレプトアビジンを介して固定化し、それに対して20 μ Mのトロンビンを流し、応答を調べた。BIAcoreにおいては、固定化された物質に分子が結合すると、センサーチップ付近の屈折率が変化し、それがレゾナンス・ユニットの変化として検出されるようになっている。

(3) シャフリング戦略の実際

最初の世代の20個体を合成し、適応度を測定したところ、上位8個体は次のようになった。なお、配列の右の数値は、BIAcore2000によって得られた、適応度の高さを表す数値である。

0-12: GG TC GG GTG GG TT GG (配列番号: 2)	1299.9
0- 8: GG CC GG TTC GG TT GG (配列番号: 3)	1281.5
0-15: GG TG GG TAC GG CT GG (配列番号: 4)	1101.9
0-17: GG CG GG GCG GG TG GG (配列番号: 5)	1077.8
0- 3: GG CA GG TAG GG TA GG (配列番号: 6)	1000.1
0- 9: GG GC GG GTC GG AT GG (配列番号: 7)	740.3

0-10: GG GC GG TTA GG CA GG (配列番号 : 8) 526.5

0-14: GG TA GG GCA GG AG GG (配列番号 : 9) 452.3

適応度が高かった上位2個体間でシャフリングを行うことにより、新たに以下のような6個体を作製した。なお、以下で左から数えて1番目、2番目、3番目の仮想エクソンを(1),(2),(3)と表す。

1- 1: GG TC GG GTG GG TT GG :0-12(1), 0-12(2), 0- 8(3) (配列番号 : 2)

1- 2: GG TC GG TTC GG TT GG :0-12(1), 0- 8(2), 0- 8(3) (配列番号 : 10)

1- 3: GG CC GG TTC GG TT GG :0- 8(1), 0- 8(2), 0-12(3) (配列番号 : 3)

1- 4: GG CC GG GTG GG TT GG :0- 8(1), 0-12(2), 0-12(3) (配列番号 : 11)

1- 5: GG TC GG TTC GG TT GG :0-12(1), 0- 8(2), 0-12(3) (配列番号 : 10)

1- 6: GG CC GG GTG GG TT GG :0- 8(1), 0-12(2), 0- 8(3) (配列番号 : 11)

また、適応度が高かった上位8個体間で、適応度の大きさに比例して仮想エクソンを残しやすいようにシャフリングを行うことにより、新たに以下のような8個体を作製した。

1- 7: GG GC GG TTC GG TT GG :0-10(1), 0- 8(2), 0-12(3) (配列番号 : 12)

1- 8: GG TC GG TAC GG AG GG :0-12(1), 0-15(2), 0-14(3) (配列番号 : 13)

1- 9: GG CG GG GCA GG AT GG :0-17(1), 0-14(2), 0- 9(3) (配列番号 : 14)

1-10: GG TG GG TAC GG TT GG :0-15(1), 0-15(2), 0- 8(3) (配列番号 : 15)

1-11: GG CG GG TAG GG AT GG :0-17(1), 0- 3(2), 0- 9(3) (配列番号 : 16)

1-12: GG TC GG TAC GG TT GG :0-12(1), 0-15(2), 0- 8(3) (配列番号 : 17)

1-13: GG GC GG GCG GG TT GG :0- 9(1), 0-17(2), 0- 8(3) (配列番号 : 18)

1-14: GG CG GG GCG GG CT GG :0-17(1), 0-17(2), 0-15(3) (配列番号 : 19)

さらに、上位3個体に対して2/7の確率で突然変異を導入し、新たに以下のような6個体を作製した。

1-15: GG TC GG GTT GG TA GG :0-12に変異を導入 (配列番号 : 20)

1-16: GG TG GG GGG GG TT GG :0-12に変異を導入 (配列番号 : 21)

1-17: GG CC GG TCC GG TG GG :0- 8に変異を導入 (配列番号 : 22)

1-18: GG CC GG CTC GG AT GG :0- 8に変異を導入 (配列番号 : 23)

1-19: GG TG GG TAA GG AT GG :0-15に変異を導入 (配列番号 : 24)

1-20: GG TT GG TAT GG CT GG :0-15に変異を導入 (配列番号 : 25)

このようにして、第2世代の20個体が準備された。この中で、1-2と1-5、及び1-4と1-6はそれぞれ同じものである。また、1-1と1-3は前の世代に存在したのと同じものである。従って、実際には、16種類の配列を新たに合成した。

以下同様にして、新世代の設計・合成と適応度の測定が繰り返された。

(4) 結果

以上のようにして世代を重ねてゆくと、トロンビン・アプタマーとして知られている配列(5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3' / 配列番号 : 1)に近いものが上位を占めるようになってきたが、同時に、それにあまり近くないGリッチな配列も一定の割合で残った。それらのGリッチな配列をよく見てみると、上に示した0-12や0-17のように、本来存在する2つのG-カルテットとは別のもうひとつのG-カルテット構造を部分的に組み得るような配列であると予想された。このことから、G-カルテットを3つ持つような配列も、トロンビンに対して高い結合能を持っているのではないかと推測された。

そこで、5'-GGGTTGGGTGGGTGGG-3' (配列番号 : 26) という、図4のような形で3つのG-カルテットを組むと予想される配列 (「tri18」と呼ぶ) を合成し、トロンビンとの結合をBIAcore2000で調べた。血中に近いイオン条件のバッファー (10mM Hepes(pH 7.4), 150mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂) のもと、37°Cで、「tri18」とトロンビンを相互作用させ、解析ソフト (BIAevaluation ver2.1 / Biocore AB社) を用いて平衡解離定数を求めたところ、この条件下で、プロトタイプのトロンビン・アプタマーと「tri18」はほぼ等しいKD値 (8.96×10^{-8} M及び 9.16×10^{-8} M、 「tri18」のKD値はプロトタイプのKD値の1.02倍) を示した。3つのG-カルテットによってもたらされる構造の安定性の高

さを考慮すると、「tri18」はプロトタイプをしのぐ有効なトロンビン阻害剤として臨床応用されると期待される。

このように、シャフリング戦略による分子設計の過程で得られた配列の情報に基づいて、これまで知られていなかった配列が、既知のものとほぼ等しいトロンビン結合能を示すことが明らかになった。

産業上の利用可能性

本発明によって、機能の高いポリペプチド又は核酸を効率的に探索することが可能となった。例えば、天然に存在するポリペプチド又は核酸の機能を飛躍的に向上させることが可能となった。更に、特定の機能を有し、天然には存在しない新規な構造を有するポリペプチド又は核酸を、自由に探索することが可能となった。

請求の範囲

1. 以下の工程を含む、機能性の高いポリペプチド又は核酸を探索する方法。
 - (a) 互いに異なる配列を有する複数のポリペプチド又は核酸を合成し、
 - (b) 合成されたポリペプチド又は核酸の適応度を実験室レベルで測定し、
 - (c) 工程 (a) で合成されたポリペプチド又は核酸を適応度に応じて順位付けし、
 - (d) 順位に応じて選択した個体間で部分構造の切り混ぜ（シャフリング）を行うことにより得られた配列からなる「シャフリング・ライブラリー」を作成し、
 - (e) 「シャフリング・ライブラリー」に属するポリペプチド又は核酸を合成し、
 - (f) 工程 (e) で得られたポリペプチド又は核酸について、さらに工程 (b) ないし工程 (e) を任意の回数繰り返す。
2. 工程 (d) において、シャフリングを行うことにより得られた配列を有するポリペプチド又は核酸とは別個に、特定の配列に対して突然変異を導入した配列を作成し「シャフリング・ライブラリー」に加えることを特徴とする、請求項 1 記載の方法。
3. 特定の配列を、工程 (c) における一定以上の順位を有する配列とする、請求項 2 記載の方法。
4. 工程 (d) において、シャフリングを行うことにより得られた配列の少なくとも 1 つに対して、更に突然変異を導入した配列を作成し「シャフリング・ライブラリー」に加えることを特徴とする、請求項 1 記載の方法。
5. 工程 (d) において、一定の順位以上の個体間のみでシャフリングを行うことを特徴とする、請求項 1～4 のいずれかに記載の方法。
6. 工程 (d) において、一定の順位以上の個体を更に、上位から下位に複数のグループとし、それぞれのグループの中でシャフリングを行うことを特徴とする、請求項 5 記載の方法。

7. 請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の方法により得られ一定以上の適応度を有する、天然には存在しないポリペプチド又は核酸。

図 1

1 / 4

HA1の101-107番目のアミノ酸残基に対応するペプチドの1アミノ酸置換体と、Fab 17/9との結合(平衡結合定数の比)

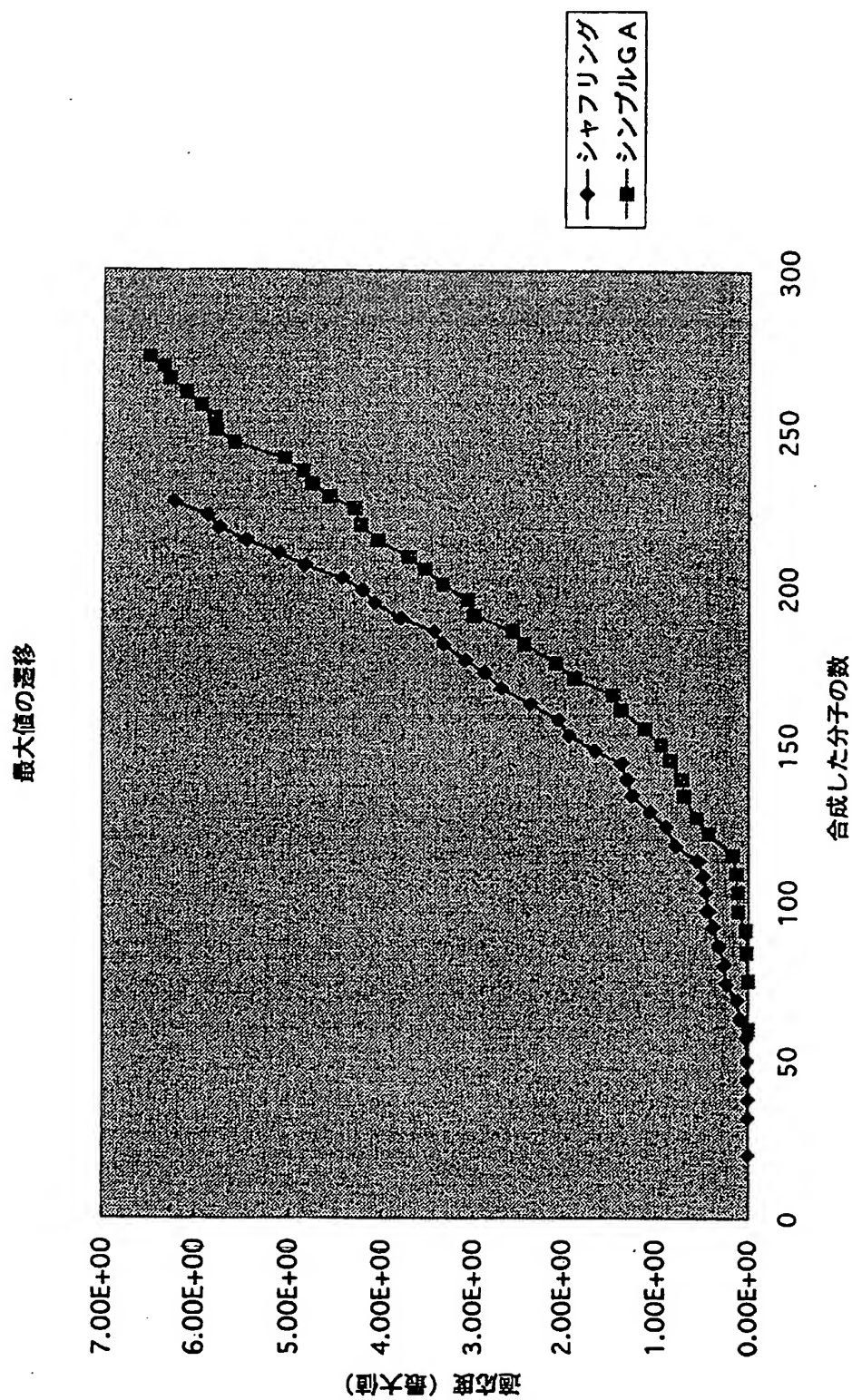
N末端からの アミノ酸の位置	アミノ酸の種類											
	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L		
1	0.0000938	0.00382	1	0.00413	0.000457	0.000562	0.00457	0.00287	0.000449	0.0000761		
2	0.0833	0.345	0.0769	0.435	0.588	0.0213	0.189	0.5	0.0909	0.588		
3	0.278	0.0256	0.417	1.25	0.0101	0.0217	0.141	0.0526	0.1	0.0345		
4	0.00005	0.000202	1	0.00192	0.0000197	0.000663	0.00813	0.000228	0.0000197	0.0000197		
5	0.000047	0.0000289	0.0000197	0.0000206	0.000102	0.0000222	0.000189	0.0000381	0.0000334	0.0000197		
6	1	0.00265	0.000608	0.00292	0.000237	0.00319	0.00617	0.0556	0.000453	0.000328		
7	1.67	1.43	10	2	0.455	0.37	0.909	0.417	0.27	1.25		

N末端からの アミノ酸の位置	アミノ酸の種類											
	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y		
1	0.147	0.00379	0.000693	0.0000862	0.0000962	0.000137	0.0000616	0.0000353	0.0000576	0.0000398		
2	0.769	0.127	0.0182	0.333	0.1	0.0909	0.345	1	0.417	0.238		
3	0.114	0.0278	1	0.313	0.0769	0.037	0.476	0.0833	0.0179	0.357		
4	0.000147	0.0217	0.0000464	0.0000753	0.0000197	0.0000337	0.000194	0.0000378	0.0000346	0.0000219		
5	0.0000265	0.0000433	0.000234	0.0000498	0.0000878	0.000121	0.0000735	0.0000221	0.000105	1		
6	0.0285	0.0185	0.00223	0.0164	0.000362	0.27	0.025	0.0625	0.000384	0.000726		
7	0.667	0.625	3.33	1.11	0.27	1	1.25	0.833	0.27	0.526		

1番目のアミノ酸がHA1の101番目のアミノ酸に対応する。

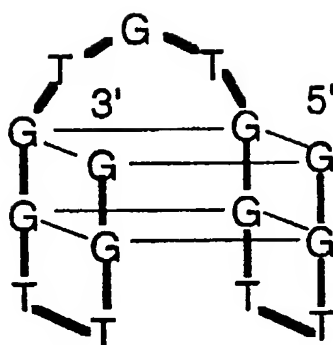
2 / 4

図 2



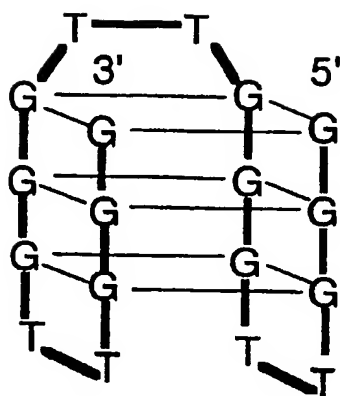
3 / 4

図 3



4 / 4

☒ 4



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> KARUBE ISAO

軽部 征夫

<120> A search strategy for highly active polypeptides or
oligonucleotides

機能性の高いポリペプチド又は核酸を探索する方法

<130> SEN-902PCT

<140>

<141>

<160> 26

<170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

2/12

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

<400> 1

ggttggtgtg gttgg

15

<210> 2

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

<400> 2

ggtcgggtgg gttgg

15

<210> 3

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

<400> 3

ggccggttcg gttgg

15

3/12

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

<400> 4

ggtgggtacg gctgg

15

<210> 5

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

<400> 5

ggcggggcgg gtggg

15

<210> 6

<211> 15

<212> DNA

4/12

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

<400> 6

ggcaggtagg gtagg

15

<210> 7

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

<400> 7

gggcgggtcg gatgg

15

<210> 8

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

5/12

<400> 8

gggcggttag gcagg

15

<210> 9

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

<400> 9

ggtagggcag gaggg

15

<210> 10

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

<400> 10

ggtcggttcg gttgg

15

6/12

<210> 11

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

<400> 11

ggccgggtgg gttgg

15

<210> 12

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

<400> 12

gggcggttcg gttgg

15

<210> 13

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

7/12

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

<400> 13

ggtcggtacg gaggg

15

<210> 14

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

<400> 14

ggcggggcag gatgg

15

<210> 15

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

8/12

<400> 15

ggtgggtacg gttgg

15

<210> 16

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

<400> 16

ggcgggtagg gatgg

15

<210> 17

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

<400> 17

ggtcgggtacg gttgg

15

<210> 18

9/12

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

<400> 18

gggcgggcgg gttgg

15

<210> 19

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

<400> 19

ggcggggcgg gctgg

15

<210> 20

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10/12

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

<400> 20

ggtcgggttg gtagg

15

<210> 21

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

<400> 21

ggtggggggg gttgg

15

<210> 22

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

<400> 22

11/12

ggccggtccg gtggg

15

<210> 23

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

<400> 23

ggccggctcg gatgg

15

<210> 24

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

<400> 24

ggtgggtaag gatgg

15

<210> 25

<211> 15

12/12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

<400> 25

ggttggtatg gctgg

15

<210> 26

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized oligonucleotide Sequence

<400> 26

gggttggtt gggttggg

18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03854

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12Q1/68, C12N15/11, C07K1/00, C07K7/00, C07K14/00, G06F15/42, C07H21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12Q1/68, C12N15/11, C07K1/00, C07K7/00, C07K14/00, G06F15/42, C07H21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAS ONLINE, BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	SUMIKURA, K. et al., "Thrombin-binding properties of thrombinaptamar derivatives", Nucleic Acids Symp. Ser., (1997) 37 (Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 1997) p.257-258	1-7
P, A	WO, 98/05764, A1 (NOVO-NORDISK AS), 10 March, 1998 (10. 03. 98) & AU, 9735394, B & JP, 10-66577, A	1-7
P, A	JP, 10-14578, A (Mitsubishi Chemical Corp.), 20 January, 1998 (20. 01. 98) (Family: none)	1-7
A	WO, 95/22625, A1 (AFFYMAX TECHNOLOGIES NV), 24 August, 1995 (24. 08. 95) & EP, 752008, A1 & US, 5605793, A & JP, 10-500561, A & AU, 9529714, B & KR, 97701268, A	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 November, 1998 (24. 11. 98)Date of mailing of the international search report
15 December, 1998 (15. 12. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03854

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Willem P.C. Stemmer et al., "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1994) 91 p.10747-10751	1-7
A	Willem P.C. Stemmer "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling", Nature, (1994) 370 p.389-391	1-7
A	FISCH, I. et al., "A strategy of exon shuffling for making large peptide repertoires displayed on filamentous bacteriophage", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1996) 93 p.7761-7766	1-7
A	CHATEAU, M. et al., "Identification of interdomain sequences promoting the intronless evolution of a bacterial protein family", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1996) 93 p.8490-8495	1-7
A	MARKS, J.D. et al., "By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling", Bio/Technology, (1992) 10(7) p.779-783	1-7
A	BERKHOUT, B. et al., "In vivo selection of randomly mutated retroviral genomes", Nuc. Acids Res., (1993) 21(22) p.5020-5024	1-7
A	BEAUDRY, A.A. et al., "Directed evolution of an RNA enzyme", Science, (1992) 257 p.635-641	1-7
A	WO, 98/04580, A1 (YAMANOUCHI PHARM CO), 5 February, 1998 (05. 02. 98) (Family: none)	1-7
A	YOKOBAYASHI, Y. et al., "Directed evolution of trypsin inhibiting peptides using a genetic algorithm", J. Chem. Soc., Perkin Transactions. 1, (1996) 20 p.2435-2437	1-7
A	SINGH, J. "Application of genetic algorithms to combinatorial synthesis: a computational approach to lead identification and lead optimization", J. Am. Chem. Soc., (1996) 118 p.1669-1676	1-7
A	FORREST, S. et al., "Genetic algorithms: principles of natural selection applied to computation", Science, (1993) 261 p.872-878	1-7
A	WEBER, L. et al., "Optimization of the biological Activity of combinatorial compound libraries by a genetic algorithm", Angewandte Chemie. International Edition in English, (1995) 34(20) p.2280-2282	1-7

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/03854

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁴ C12Q1/68, C12N15/11, C07K1/00, C07K7/00, C07K14/00, G06F15/42, C07H21/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁴ C12Q1/68, C12N15/11, C07K1/00, C07K7/00, C07K14/00, G06F15/42, C07H21/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAS ONLINE BIOSIS PREVIEWS		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	SUMIKURA, K. et al. 'Thrombin-binding properties of thrombin aptamar derivatives', Nucleic Acids Symp. Ser., (1997) 37 (Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 1997) p. 257-258	1-7
P, A	WO, 98/05764, A1 (NOVO-NORDISK AS) 10. 3月. 1998 (10. 03. 98) & AU, 9735394, B & JP, 10-66577, A	1-7
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 24. 11. 98	国際調査報告の発送日 15.12.98	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 大久保元浩 印	4H 8828
電話番号 03-3581-1101 内線 3445		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, A	JP, 10-14578, A(三菱化学株式会社) 20. 1月. 1998 (20. 01. 98) (ファミリーなし)	1-7
A	WO, 95/22625, A1 (AFFYMAX TECHNOLOGIES NV) 24. 8月. 1995 (24. 08. 95) & EP, 752008, A1 & US, 5605793, A & JP, 10-500561, A & AU, 9529714, B & KR, 97701268, A	1-7
A	Willem P.C. Stemmer et al. 'DNA shuffling by random fragmentation and reassembly : In vitro recombination for molecular evolution' , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1994) 91 p. 10747-10751	1-7
A	Willem P.C. Stemmer 'Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling' , Nature, (1994) 370 p. 389-391	1-7
A	FISCH, I. et al. 'A strategy of exon shuffling for making large peptide repertoires displayed on filamentous bacteriophage' , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1996) 93 p. 7761-7766	1-7
A	CHATEAU, M. et al. 'Identification of interdomain sequences promoting the intronless evolution of a bacterial protein family' , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1996) 93 p. 8490-8495	1-7
A	MARKS, J. D. et al. 'By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling' , Bio/Technology, (1992) 10(7) p. 779-783	1-7
A	BERKHOUT, B. et al. 'In vivo selection of randomly mutated retroviral genomes' , Nuc. Acids Res., (1993) 21(22) p. 5020-5024	1-7
A	BEAUDRY, A. A. et al. 'Directed evolution of an RNA enzyme' , Science, (1992) 257 p. 635-641	1-7
A	WO, 98/04580, A1 (YAMANOUCHI PHARM CO) 05. 2月. 1998 (05. 02. 98) (ファミリーなし)	1-7

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	YOKOBAYASHI, Y. et al. 'Directed evolution of trypsin inhibiting peptides using a genetic algorithm', J. Chem. Soc., Perkin Transactions. 1, (1996) 20 p. 2435-2437	1-7
A	SINGH, J. 'Application of genetic algorithms to combinatorial synthesis: a computational approach to lead identification and lead optimization', J. Am. Chem. Soc., (1996) 118 p. 1669-1676	1-7
A	FORREST, S. et al. 'Genetic algorithms: principles of natural selection applied to computation', Science, (1993) 261 p. 872-878	1-7
A	WEBER, L. et al. 'Optimization of the biological Activity of combinatorial compound libraries by a genetic algorithm', Angewandte Chemie. International Edition in English, (1995) 34(20) p. 2280-2282	1-7



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12Q 1/68, C12N 15/11, C07K 1/00, 7/00, 14/00, C07H 21/00	A1	(11) 国際公開番号 WO99/11818 (43) 国際公開日 1999年3月11日(11.03.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03854 (22) 国際出願日 1998年8月28日(28.08.98) (30) 優先権データ 特願平9/249679 1997年8月28日(28.08.97) JP (71) 出願人 ; および (72) 発明者 軽部征夫(KARUBE, Isao)[JP/J] 〒216-0002 神奈川県川崎市宮前区東有馬一丁目3番16号 Kanagawa, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 岡部洋一(OKABE, Yoichi)[JP/J] 〒169-0051 東京都新宿区西早稲田一丁目22-3-2702 Tokyo, (JP) 隅藏康一(SUMIKURA, Koichi)[JP/J] 〒153-0041 東京都目黒区駒場四丁目6-20-102 Tokyo, (JP)		(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP) (81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーロシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類 (88) 改訂された国際調査報告書の公開日 : 1999年4月15日(15.04.99)
(54) Title: METHOD FOR DETECTING HIGHLY FUNCTIONAL POLYPEPTIDES OR NUCLEIC ACIDS (54) 発明の名称 機能性の高いポリペプチド又は核酸を探索する方法 (57) Abstract A molecular design method which fundamentally comprises artificially reconstructing genes by means of exon shuffle among a number of individuals. More particularly, this method comprises the steps of (a) synthesizing a number of polypeptides or nucleic acids differing in sequence from each other; (b) measuring the fitness of the synthesized polypeptides or nucleic acids on the laboratory level, (c) ranking the polypeptides or nucleic acids synthesized in step (a) depending on the fitness; (d) preparing a "shuffling library" of the sequences obtained by shuffling the partial structures among individuals selected depending on the rank; (e) synthesizing polypeptides or nucleic acids belonging to the above library; and (f) repeating the procedures of steps (b) to (e) arbitrary times with the use of the polypeptides or nucleic acids obtained in step (e). By using this method, molecules can be evolved drastically and quickly as compared with the conventional genetic algorithm, which makes it possible to efficiently detect functional polymers, in particular, polypeptides or nucleic acids having specific functions and having novel structures which never occur in nature.		

(57)要約

この発明は、複数の個体間でのエキソン・シャフリング様の遺伝子の再編成を人工的に行うことを基本とする分子設計法に関する。

具体的には、(a) 互いに異なる配列を有する複数のポリペプチド又は核酸を合成し、(b) 合成されたポリペプチド又は核酸の適応度を実験室レベルで測定し、(c) (a) で合成されたポリペプチド又は核酸を適応度に応じて順位付けし、(d) 順位に応じて選択した個体間で部分構造のシャフリングを行って得られる配列の「シャフリング・ライブラリー」を作成し、(e) 該ライブラリーに属するポリペプチド又は核酸を合成し、(f) (e) で得られたポリペプチド又は核酸について、さらに(b)～(e)を任意の回数繰り返す、工程を含む。

この方法により、従来の遺伝的アルゴリズムよりも劇的で迅速な分子の進化を行わせることができ、機能性高分子の、特に特定の機能を有し天然には存在しない新規な構造を有するポリペプチド又は核酸の効率的な検索が可能となった。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		

REVISED
VERSION

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03854

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12Q1/68, C12N15/11, C07K1/00, C07K7/00, C07K14/00, C07H21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12Q1/68, C12N15/11, C07K1/00, C07K7/00, C07K14/00, C07H21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAS ONLINE, BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	SUMIKURA, K. et al., "Thrombin-binding properties of thrombinaptamar derivatives", Nucleic Acids Symp. Ser., (1997) 37 (Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 1997) p.257-258	1-7
P, A	WO, 98/05764, A1 (NOVO-NORDISK AS), 10 March, 1998 (10. 03. 98) & AU, 9735394, B & JP, 10-66577, A	1-7
P, A	JP, 10-14578, A (Mitsubishi Chemical Corp.), 20 January, 1998 (20. 01. 98) (Family: none)	1-7
A	WO, 95/22625, A1 (AFFYMAX TECHNOLOGIES NV), 24 August, 1995 (24. 08. 95) & EP, 752008, A1 & US, 5605793, A & JP, 10-500561, A & AU, 9529714, B & KR, 97701268, A	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 November, 1998 (24. 11. 98)

Date of mailing of the international search report
15 December, 1998 (15. 12. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03854

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Willem P.C. Stemmer et al., "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1994) 91 p.10747-10751	1-7
A	Willem P.C. St��mmer "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling", Nature, (1994) 370 p.389-391	1-7
A	FISCH, I. et al., "A strategy of exon shuffling for making large peptide repertoires displayed on filamentous bacteriophage", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1996) 93 p.7761-7766	1-7
A	CHATEAU, M. et al., "Identification of interdomain sequences promoting the intronless evolution of a bacterial protein family", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1996) 93 p.8490-8495	1-7
A	MARKS, J.D. et al., "By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling", Bio/Technology, (1992) 10(7) p.779-783	1-7
A	BERKHOUT, B. et al., "In vivo selection of randomly mutated retroviral genomes", Nuc. Acids Res., (1993) 21(22) p.5020-5024	1-7
A	BEAUDRY, A.A. et al., "Directed evolution of an RNA enzyme", Science, (1992) 257 p.635-641	1-7
A	WO, 98/04580, A1 (YAMANOUCI PHARM CO), 5 February, 1998 (05. 02. 98) (Family: none)	1-7
A	YOKOBAYASHI, Y. et al., "Directed evolution of trypsin inhibiting peptides using a genetic algorithm", J. Chem. Soc., Perkin Transactions. 1, (1996) 20 p.2435-2437	1-7
A	SINGH, J. "Application of genetic algorithms to combinatorial synthesis: a computational approach to lead identification and lead optimization", J. Am. Chem. Soc., (1996) 118 p.1669-1676	1-7
A	FORREST, S. et al., "Genetic algorithms: principles of natural selection applied to computation", Science, (1993) 261 p.872-878	1-7
A	WEBER, L. et al., "Optimization of the biological Activity of combinatorial compound libraries by a genetic algorithm", Angewandte Chemie. International Edition in English, (1995) 34(20) p.2280-2282	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int. Cl⁶ C12Q1/68, C12N15/11, C07K1/00, C07K7/00, C07K14/00, C07H21/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int. Cl⁶ C12Q1/68, C12N15/11, C07K1/00, C07K7/00, C07K14/00, C07H21/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE
BIOSIS PREVIEWS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	SUMIKURA, K. et al. 'Thrombin-binding properties of thrombin aptamar derivatives', Nucleic Acids Symp. Ser., (1997) 37 (Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 1997) p. 257-258	1-7
P, A	WO, 98/05764, A1 (NOVO-NORDISK AS) 10. 3月. 1998 (10. 03. 98) & AU, 9735394, B & JP, 10-66577, A	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 11. 98

国際調査報告の発送日

15.12.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大久保 元 浩

4 H

8828

電話番号 03-3581-1101 内線 3445

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, A	JP, 10-14578, A(三菱化学株式会社) 20. 1月. 1998 (20. 01. 98) (ファミリーなし)	1-7
A	WO, 95/22625, A1 (AFFYMAX TECHNOLOGIES NV) 24. 8月. 1995 (24. 08. 95) & EP, 752008, A1 & US, 5605793, A & JP, 10-500561, A & AU, 9529714, B & KR, 97701268, A	1-7
A	Willem P. C. Stemmer et al. 'DNA shuffling by random fragmentation and reassembly : In vitro recombination for molecular evolution' , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1994) 91 p. 10747-10751	1-7
A	Willem P. C. Stemmer 'Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling' , Nature, (1994) 370 p. 389-391	1-7
A	FISCH, I. et al. 'A strategy of exon shuffling for making large peptide repertoires displayed on filamentous bacteriophage' , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1996) 93 p. 7761-7766	1-7
A	CHATEAU, M. et al. 'Identification of interdomain sequences promoting the intronless evolution of a bacterial protein family' , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1996) 93 p. 8490-8495	1-7
A	MARKS, J. D. et al. 'By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling' , Bio/Technology, (1992) 10(7) p. 779-783	1-7
A	BERKHOUT, B. et al. 'In vivo selection of randomly mutated retroviral genomes' , Nuc. Acids Res., (1993) 21(22) p. 5020-5024	1-7
A	BEAUDRY, A. A. et al. 'Directed evolution of an RNA enzyme' , Science, (1992) 257 p. 635-641	1-7
A	WO, 98/04580, A1 (YAMANOUCHI PHARM CO) 05. 2月. 1998 (05. 02. 98) (ファミリーなし)	1-7

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	YOKOBAYASHI, Y. et al. 'Directed evolution of trypsin inhibiting peptides using a genetic algorithm', J. Chem. Soc., Perkin Transactions. 1, (1996) 20 p. 2435-2437	1-7
A	SINGH, J. 'Application of genetic algorithms to combinatorial synthesis: a computational approach to lead identification and lead optimization', J. Am. Chem. Soc., (1996) 118 p. 1669-1676	1-7
A	FORREST, S. et al. 'Genetic algorithms: principles of natural selection applied to computation', Science, (1993) 261 p. 872-878	1-7
A	WEBER, L. et al. 'Optimization of the biological Activity of combinatorial compound libraries by a genetic algorithm', Angewandte Chemie. International Edition in English, (1995) 34(20) p. 2280-2282	1-7
		-